

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

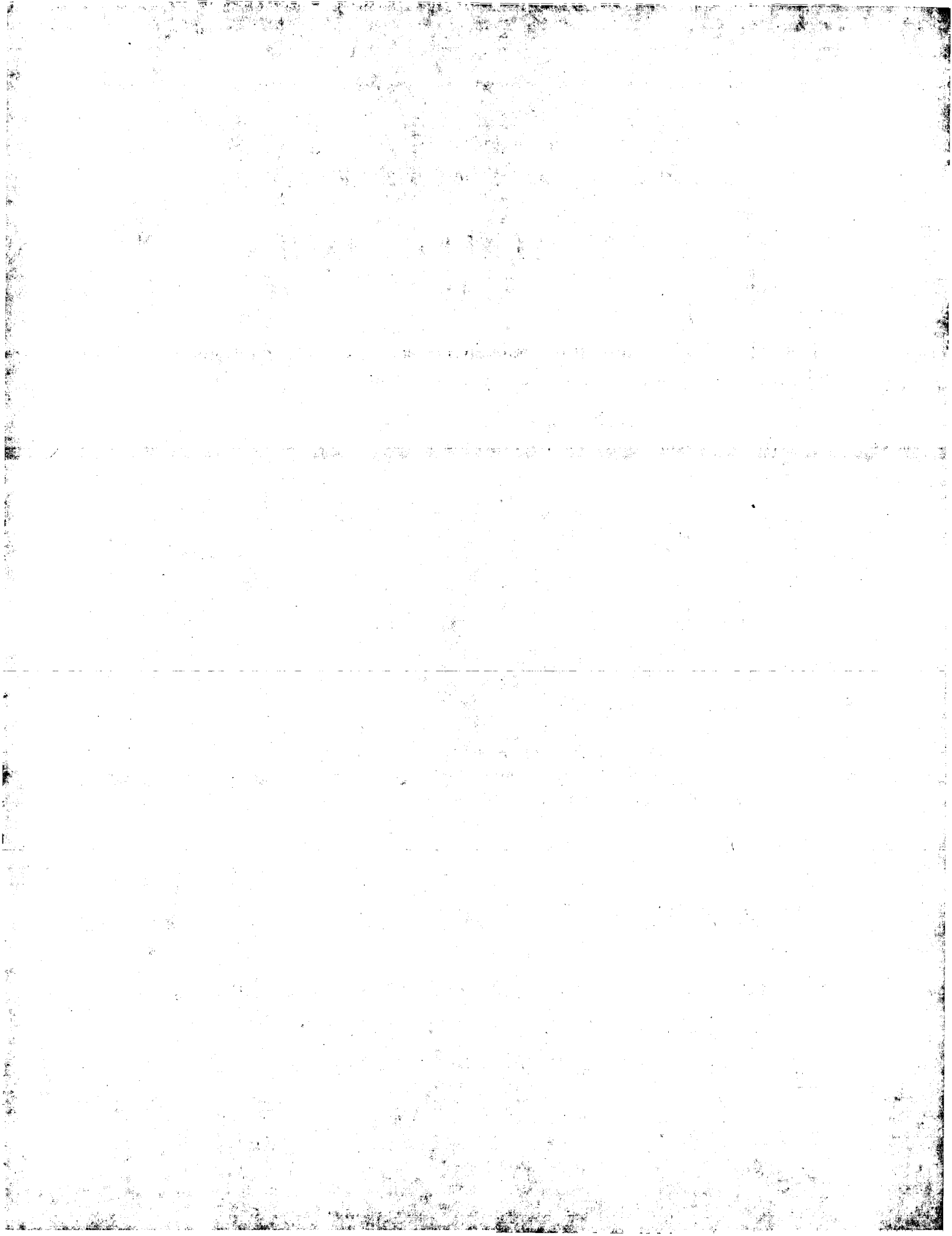
Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



PCT

Express Mail No. 400954374US 世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C12N 15/00, C12P 21/00	A1	(11) 国際公開番号 WO98/07840 (43) 国際公開日 1998年2月26日 (26.02.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/02859 (22) 国際出願日 1997年8月19日 (19.08.97) (30) 優先権データ 特願平8/235928 1996年8月19日 (19.08.96) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 雪印乳業株式会社 (SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD.) [JP/JP] 〒065 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号 Hokkaido, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 中川信明 (NAKAGAWA, Nobuaki) [JP/JP] 〒329-05 栃木県下都賀郡石橋町石橋578-15 西浦ハイツ2-4 Tochigi, (JP) 保田尚孝 (YASUDA, Hisataka) [JP/JP] 〒329-04 栃木県河内郡南河内町緑2-3293-46 Tochigi, (JP) 森永伴法 (MORINAGA, Tomonori) [JP/JP] 〒321-02 栃木県下都賀郡壬生町幸町3-11-12 Tochigi, (JP)		(74) 代理人 弁理士 藤野清也 (FUJINO, Seiya) 〒160 東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, CA, CN, FI, HU, IL, KR, MX, NO, NZ, RU, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: <u>NOVEL DNAS AND PROCESS FOR PRODUCING PROTEINS BY USING THE SAME</u> (54) 発明の名称 新規DNA及びそれを用いた蛋白質の製造方法 (57) Abstract DNAs represented by Sequence Listings (1 and 2) and a process for producing proteins which comprises inserting these DNAs into expression vectors to thereby produce proteins having molecular weights of about 60 kD (under reductive conditions) and about 60 kD and about 120 kD (under nonreductive conditions) and being capable of inhibiting the formation of osteoclasts. These proteins are useful in the treatment of osteoporosis and rheumatism.		

300 PAGE BLANK (uspto)

Express Mail No. EM400954374US

(Translation)

INTERNATIONAL FORM

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION
OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE
PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the INTERNATIONAL
DEPOSITARY AUTHORITY identified at the bottom
of this page.

TO DEPOSITOR:

Name: Research Institute of Life Science
Snow Brand Milk Products Co., Ltd.
General Manager: Yasuyoshi TAKESHITA
Address: 519 Aza Hanabayashi, Ohaza Shimoishibashi,
Ishibashi-cho, Shimotsuga-gun, Tochigi-ken,
329-05, JAPAN

I. IDENTIFICATION OF MICROORGANISM	
Identification Reference Given by the Depositor: PBK/01F10	Accession Number: FERM BP-5267
II. A SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC POSITION	
The microorganism identified under I above was accompanied by a document stating the following item(s). <input type="checkbox"/> A Scientific Property <input checked="" type="checkbox"/> Taxonomic position	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This authority accepts the microorganism identified under I above, which was received on June 21, 1995	
IV. RECEIPT OF TRANSFER	
This authority received the microorganism identified under I above on June 21, 1995 and the request for the transfer to the deposit based on the Budapest Treaty on October 25, 1995. (It was transferred from BIKOKEN-KINKI No. P-14998 which was deposited on June 21, 1995.)	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology Ministry of International Trade and Industry Representative: Michio OISHI (Sealed) Dr., DIRECTOR GENERAL Address: 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305, JAPAN	
Date: October 25, 1995	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Express Mail No: EM400954374US

〔特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約〕

下記国際寄託当局によって規則 7.1 に従い
発行される

原寄託についての受託証

氏名 (名称) 雪印乳業株式会社 生物科学研究所
寄託者 所長 竹下 保義 殿
あて名 ③ 329-05
栃木県下都賀郡石橋町大字下石橋字花井
519番地

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

I. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)
PBK/01F10

(受託番号)
FERM BP- 5267

II. 科学的性質及び分類学上の位置

【上の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

- ☐ 科学的性質
☒ 分類学上の位置

III. 受理及び受託

本国際寄託当局は、平成 7年 6月21日 (原寄託日) に受理したI欄の微生物を受託する。

IV. 移管請求の受理

本国際寄託当局は、平成 7年 6月21日 (原寄託日) にI欄の微生物を受託した。
そして、平成 7年 10月25日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。
平成 7年 6月21日に寄託された数工研寄第 P- 14998 号より移管)

V. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

名称: National Institute of Advanced Science and Human-Technology
Agency of Science and Technology

所長 大石 道夫

Michio Oishi, Ph.D., DIRECTOR GENERAL.

あて名: 日本国茨城県つくば市T目1番3号 (郵便番号 305)
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken
305, JAPAN

平成 7年 (1995) 10月 25日

THIS PAGE BLANK (USPTO)



P.B. 5818 - Patentlaan 2
2280 HV Rijswijk (ZH)
☎ (070) 3 40 20 40
TX 31651 epo nl
FAX (070) 3 40 30 16

Europäisches
Patentamt

Zweigstelle
in Den Haag
Recherchen-
abteilung

European
Patent Office

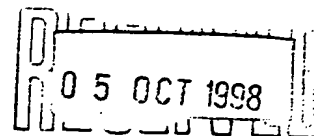
Branch at
The Hague
Search
division

Office européen
des brevets

Département à
La Haye
Division de la
recherche

Wakerley, Helen Rachael
Reddie & Grose,
16 Theobalds Road
London WC1X 8PL
GRANDE BRETAGNE

VISTEN	TERM:
TECH. NO. <i>19</i>	
EUROPEAN	DATE:
FOREIGN	
REGULATORY	INITIALS
APP.	CHECKED



Datum/Date

30. 09. 1998

Zeichen/Ref./Réf. 39686/HRW	Anmeldung Nr./Application No./Demande n°/Patent Nr./Patent No./Brevet n°. 97935810.8
Anmelder/Applicant/Demandeur/Patentinhaber/Proprietor/Titulaire SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD.	

COMMUNICATION

The European Patent Office herewith transmits

- ☐ the European search report
- ☐ the declaration under Rule 45 EPC
- ☐ the partial European search report under Rule 45 EPC
- ☒ the supplementary European search report concerning the international application under Article 157(2) EPC relating to the above-mentioned European patent application. Copies of the documents cited in the search report are enclosed.

The following specifications given by the applicant have been approved by the Search Division :

- ☐ Abstract ☐ Title ☐ Figure
- ☐ The abstract was modified by the Search Division and the definitive text is attached to this communication.
- ☐ The following figure will be published with the abstract, since the Search Division considers that it better characterises the invention than the one indicated by the applicant.

Figure:

- ☒ Additional copy(copies) of the documents cited in the European search report.

REFUND OF THE SEARCH FEE

If applicable under Article 10 Rules relating to fees, a separate communication from the Receiving Section on the refund of the search fee will be sent later.



EPO Form 1507 02.93



Eur p an Patent
Office

SUPPLEMENTARY
EUROPEAN SEARCH REPORT

Application Number
EP 97 93 5810

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.6)
E	EP 0 816 380 A (SNOW BRAND MILK PROD CO LTD) 7 January 1998 * abstract *	1-4	C12N15/12 C07K14/705
P,X	WO 97 23614 A (AMGEN INC ;BOYLE WILLIAM J (US); LACEY DAVID L (US); CALZONE FRANK) 3 July 1997 * abstract *	1-4	
A	SUDA T ET AL: "Modulation of osteoclast differentiation by local factors" BONE, vol. 17, no. 2 (suppl), August 1995, pages 87S-91S, XP002076437		
P,A	TSUDA E ET AL: "Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis" BIOCH. BIOPHYS. RES. COMM., vol. 234, 8 May 1997, pages 137-142, XP002076438		
P,A	REDDI A.: "Bone morphogenesis and modelling: soluble signals sculpt osteosomes in the solid state " CELL, vol. 89, 18 April 1997, pages 159-161, XP002076439		
			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.6)
			C07K C12N
The supplementary search report has been drawn up for the claims attached hereto.			
Place of search THE HAGUE		Date of completion of the search 10 September 1998	Examiner Lonnoy, O
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS			
X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document		T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document	

activity of inhibiting differentiation and/or maturation of osteoclasts and having the following physicochemical characteristics,

(a) molecular weight (SDS-PAGE):

(i) Under reducing conditions: about 60 kD,

(ii) Under non-reducing conditions: about 60 kD and about 120 kD;

(b) amino acid sequence:

includes an amino acid sequence of the Sequence ID No. 3 of the Sequence Table,

(c) affinity:

exhibits affinity to a cation exchanger and heparin, and

(d) heat stability:

(i) the osteoclastogenesis-inhibitory activity is reduced when treated with heat at 70°C for 10 minutes or at 56°C for 30 minutes,

(ii) the osteoclastogenesis-inhibitory activity is lost when treated with heat at 90°C for 10 minutes,

the process comprising inserting a DNA including the nucleotide sequences of the sequences No. 1 and No. 2 in the Sequence Table into an expression vector, producing a vector capable of expressing a protein having the above-mentioned physicochemical characteristics and exhibiting the activity of inhibiting differentiation and/or maturation of osteoclasts, and producing this protein by a genetic engineering technique.

**ANNEX TO THE EUROPEAN SEARCH REPORT
ON EUROPEAN PATENT APPLICATION NO.**

EP 97 93 5810

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned European search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

10-09-1998

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0816380 A	07-01-1998	AU 4677396 A	11-09-1996
		FI 973402 A	17-10-1997
		NO 973801 A	20-10-1997
		CA 2213469 A	29-08-1996
		CN 1175956 A	11-03-1998
		WO 9626217 A	29-08-1996
WO 9723614 A	03-07-1997	AU 1468697 A	17-07-1997
		CA 2210467 A	03-07-1997
		CN 1182452 A	20-05-1998
		DE 19654610 A	26-06-1997
		EP 0784093 A	16-07-1997
		FR 2742767 A	27-06-1997
		GB 2312899 A	12-11-1997
		NO 973699 A	21-10-1997
		PL 321938 A	05-01-1998

E P

US

P C T

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)
[P C T 1 8 条、P C T 規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 S N O W - 1 1 5	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 2 2 0) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 9 7 / 0 2 8 5 9	国際出願日 (日.月.年) 1 9 . 0 8 . 9 7	優先日 (日.月.年) 1 9 . 0 8 . 9 6
出願人 (氏名又は名称) 雪印乳業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (P C T 1 8 条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。
2. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。
3. ☒ この国際出願は、ヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列リストを含んでおり、次の配列リストに基づき国際調査を行った。
 - ☒ この国際出願と共に提出されたもの
 - ☐ 出願人がこの国際出願とは別に提出したもの
 - ☐ しかし、出願時の国際出願の開示の範囲を越える事項を含まない旨を記載した書面が添付されていない
 - ☐ この国際調査機関が書換えたもの

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 (P C T 規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
 第 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。 ☒ なし
☐ 出願人は図を示さなかった。
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. cl.⁶ C12N15/00, C12P21/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. cl.⁶ C12N15/00, C12P21/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, GENETYX-CDROM, BIOSIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Cancer Research, (1995), VOL.55, Toshiyuki Yoneda. et al 「Sumarin suppresses hypercalcemia and osteoclastic bone resorption in nude mice bearing a human squamous cancer」 P.1989-1993	1-4
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1990) VOL.87 Kukita A. et al 「Osteoinductive factor inhibits formation of human osteoclast-like cells」 P.3023-3026	1-4

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
29.09.97

国際調査報告の発送日

07.10.97

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
藤田 節



4 B 8515

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

THIS PAGE BLANK (USPTO)



(51) 国際特許分類6 C12N 15/00, C12P 21/00	A1	(11) 国際公開番号 WO98/07840 (43) 国際公開日 1998年2月26日(26.02.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/02859 (22) 国際出願日 1997年8月19日(19.08.97) (30) 優先権データ 特願平8/235928 1996年8月19日(19.08.96) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 雪印乳業株式会社 (SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD.)[JP/JP] 〒065 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号 Hokkaido, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ) 中川信明(NAKAGAWA, Nobuaki)[JP/JP] 〒329-05 栃木県下都賀郡石橋町石橋578-15 西浦ハイツ2-4 Tochigi, (JP) 保田尚孝(YASUDA, Hisataka)[JP/JP] 〒329-04 栃木県河内郡南河内町緑2-3293-46 Tochigi, (JP) 森永伴法(MORINAGA, Tomonori)[JP/JP] 〒321-02 栃木県下都賀郡壬生町幸町3-11-12 Tochigi, (JP)		(74) 代理人 弁理士 藤野清也(FUJINO, Seiya) 〒160 東京都新宿区四谷1丁目2番1号 三浜ビル8階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, CA, CN, FI, HU, IL, KR, MX, NO, NZ, RU, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: NOVEL DNAS AND PROCESS FOR PRODUCING PROTEINS BY USING THE SAME ✓ (54) 発明の名称 新規DNA及びそれを用いた蛋白質の製造方法 (57) Abstract DNAs represented by Sequence Listings (1 and 2) and a process for producing proteins which comprises inserting these DNAs into expression vectors to thereby produce proteins having molecular weights of about 60 kD (under reductive conditions) and about 60 kD and about 120 kD (under nonreductive conditions) and being capable of inhibiting the formation of osteoclasts. These proteins are useful in the treatment of osteoporosis and rheumatism.		

(57) 要約

配列表 1 及び 2 で示される DNA および該 DNA を発現ベクターに挿入し、遺伝子工学的手法によって分子量約 60kD (還元条件下) の約 60kD 及び約 120kD (非還元条件下) の破骨細胞形成抑制作用を有する蛋白質を製造する方法。

この蛋白質は、破骨細胞形成抑制作用を有し、骨粗鬆症、リウマチ症の治療に有用である。

PCT に基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に記載された PCT 加盟国を同定するために使用されるコード (参考情報)

AL	アルバニア	ES	スペイン	LK	スリランカ	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FR	フランス	LS	レソト	SI	スロベニア
AU	オーストラリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SK	スロヴァキア共和国
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SL	シエラレオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SN	セネガル
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GN	ギニア	MD	モルドヴァ共和国	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GM	ギニアビサウ	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GW	ギニアビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴス ラヴィア共和国	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	ML	マリ	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	ID	インドネシア	MR	モリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UA	ウクライナ
CC	中央アフリカ共和国	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CG	コンゴ	IS	アイスランド	NE	ニジェール	US	米国
CH	スイス	IT	イタリア	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CI	コート・ジボアール	JP	日本	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CM	カメルーン	KE	ケニア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CN	中国	KG	キルギスタン	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CU	キューバ	KP	朝鮮民主主義人民共和国	PL	ポーランド		
CZ	チェコ共和国	KR	大韓民国	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	RU	ロシア連邦		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SD	スーダン		

明 細 書

新規DNA及びそれを用いた蛋白質の製造方法

技術分野

本発明は、新規なDNA、及びそれを用いて遺伝子工学的手法により破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性（以下、破骨細胞形成抑制活性という）を有する蛋白質を製造する方法に関する。詳しくは、破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質OCIFをコードするゲノムDNA、及びこのゲノムDNAを用いて遺伝子工学的手法により該蛋白質を製造する方法に関する。

発明の背景

人の骨は絶えず吸収と再形成を繰り返しているが、この過程で中心的な働きをしている細胞が、骨形成を担当する骨芽細胞と骨吸収を担当する破骨細胞である。これらの細胞が担当している骨代謝の異常により発生する疾患の代表として骨粗鬆症が挙げられる。この疾患は骨芽細胞による骨形成を破骨細胞による骨吸収が上回ることにより発生する疾患である。この疾患の発生メカニズムについては未だ完全には解明されていないが、この疾患は骨の疼痛を発生し、骨の脆弱化による骨折の原因となる疾患である。高齢人口の増加に伴い、骨折による寝たきり老人の発生の原因となるこの疾患は社会問題にもなっており、その治療薬の開発が急務となっている。このような骨代謝異常による骨量減少症は骨吸収の抑制、骨形成の促進、或いはこれらのバランスの改善により治療することが期待される。

骨形成は、骨形成を担当する細胞の増殖、分化、活性化を促進すること、或いは骨吸収を担当する細胞の増殖、分化、活性化を抑制することにより促進することが期待される。近年、このような活性を有する生理活性蛋白質（サイトカイン）への関心が高まり、精力的な研究が行われている。骨芽細胞の増殖或いは分化を

促進するサイトカインとして、線維芽細胞増殖因子ファミリー(fibroblast growth factor ; FGF : Rodan S.B. et al., Endocrinology vol. 121, p1917, 1987)、インシュリン様増殖因子-I(insulin like growth factor-I ; IGF-I : Hock J. M. et al., Endocrinology vol. 122, p254, 1988)、インシュリン様増殖因子-II (IGF-II: McCarthy T. et al., Endocrinology vol.124, p301, 1989)、アクチビンA(Activin A ; Centrella M. et al., Mol. Cell. Biol. vol. 11, p250, 1991)、トランスフォーミング増殖因子- β (transforming growth factor- β ; Noda M., The Bone, vol. 2, p29, 1988)、バスキュロトロピン(Vasculotropin ; Varonique M. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. vol. 199, p380, 1994)、及び異所骨形成因子ファミリー(bone morphogenic protein ; BMP : BMP-2 ; Yamaguchi, A et al., J. Cell Biol. vol. 113, p682, 1991, OP-1 ; Sampath T. K. et al., J. Biol. Chem. vol. 267, p20532, 1992, Knutson R. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. vol.194, p1352, 1993)等のサイトカインが報告されている。

一方、破骨細胞形成、即ち破骨細胞形成の分化及び／又は成熟を抑制するサイトカインとしては、トランスフォーミング増殖因子- β (transforming growth factor- β ; Chenu C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.85, p5683, 1988)やインターロイキン-4(interleukin-4 ; Kasano K. et al., Bone-Miner., vol. 21, p179, 1993)等が報告されている。又、破骨細胞による骨吸収を抑制するサイトカインとしては、カルシトニン(calcitonin ; Bone-Miner., vol.17, p347, 1992)、マクロファージコロニー刺激因子(macrophage colony-stimulating factor; Hattersley G. et al. J.Cell. Physiol. vol.137, p199, 1988)、インターロイキン-4(Watanabe, K. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. vol. 172, p1035, 1990)、及びインターフェロン- γ (interferon- γ ; Gowen M. et al., J. Bone Miner. Res., vol. 1, p469, 1986)等が報告されている。

これらのサイトカインは、骨形成の促進や骨吸収の抑制による骨量減少症の改善剤となることが期待され、インシュリン様増殖因子-I や異所骨形成因子ファミリーのサイトカイン等、上記のサイトカインの一部については骨代謝改善剤として臨床試験が実施されている。又、カルシトニンは、骨粗鬆症の治療薬、疼痛軽減薬として既に市販されている。又、現在、骨に関わる疾患の治療及び治療期間の短縮を図る医薬品として、臨床では活性型ビタミンD₃、カルシトニン及びその誘導体、エストラジオール等のホルモン製剤、イブリフラボン又はカルシウム製剤等が使用されている。しかし、これらを用いた治療法はその効果並びに治療結果において必ずしも満足できるものではなく、これらに代わる新しい治療薬の開発が望まれていた。

本発明者らは、このような状況に鑑み鋭意探索の結果、既にヒト胎児肺線維芽細胞 IMR-90 (ATCC寄託-受託番号 CCL186)の培養液に破骨細胞形成抑制活性、即ち破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質OCIFを見出している (PCT/JP96/00374号)。この破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質OCIFの由来について、さらに鋭意探索したところ、ヒト由来OCIFのゲノムDNAの塩基配列を決定するに至った。即ち、本発明は破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質OCIFをコードするゲノムDNA、及びそれを用いて遺伝子工学的手法により該蛋白質を製造する方法を提供することを課題とする。

発明の開示

本発明は、破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質OCIFをコードするゲノムDNA、及びそれを用いて遺伝子工学的手法により該蛋白質を製造する方法に関する。本発明のDNAは、配列表配列番号1及び2の塩基配列を含む。

また、本発明は、配列表配列番号1及び2の塩基配列を含むDNAを発現ベクターに挿入して次の物理化学的性質をもち、破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性のある蛋白質を発現することのできるベクターを作成し、これを用いて遺伝

子工学的手法により該蛋白質を製造する方法に関する。

(a) 分子量(SDS-PAGE による) ;

(i) 還元条件下で約60kD

(ii) 非還元条件下で約60kD及び約120kD

(b) アミノ酸配列;

配列表配列番号3のアミノ酸配列を有する。

(c) 親和性 ;

陽イオン交換体及びヘパリンに親和性を有する。

(d) 熱安定性 ;

(i) 70℃、10分間または56℃、30分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が低下する。

(ii) 90℃、10分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が失われる。

本発明の遺伝子を発現させることにより得られる蛋白質は、破骨細胞形成抑制活性を有し、骨粗鬆症などの骨量減少症、リウマチ又は変形性関節症などの骨代謝異常疾患、あるいは多発性骨髄腫瘍などの骨代謝異常疾患の治療及び改善を目的とした医薬組成物として、あるいはこのような疾患の免疫学的診断を確立するための抗原として有用である。

図面の簡単な説明

第1図は、実施例4(iii)における、本発明ゲノムDNAを発現して得られた蛋白質の、ウェスタンブロッティングの結果を示す。ここで 1はマーカー、2はベクターpWESR α OCIFをトランスフェクトした COS7 細胞培養上清(実施例4(iii))、3はベクターpWESR α をトランスフェクトした COS7 細胞培養上清(対照)である。

発明を実施するための最良の形態

本発明の破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質OCIFをコードするゲノムDNAは、ヒト胎盤ゲノムDNAとコスミドベクターを用いてコスミドライブラリーを作製し、このライブラリーをOCIF cDNAをもとに作製したDNA断片をプローブとしてスクリーニングすることにより得られる。このようにして得られたゲノムDNAを適当な発現ベクターに挿入してOCIF発現コスミドを作製し、常法により各種の細胞及び菌株などの宿主にトランスフェクトして発現させることにより、組み換え型OCIFを製造することができる。得られた破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質（破骨細胞形成抑制因子）は、骨粗鬆症等の骨量減少症或いはその他の骨代謝異常疾患の治療及び改善を目的とした医薬組成物として、或いはこのような疾患の免疫学的診断を確立するための抗原として有用である。本発明の蛋白質は、製剤化して経口或いは非経口的に投与することができる。即ち、本発明の蛋白質を含む製剤は、破骨細胞形成抑制因子を有効活性成分として含む医薬組成物としてヒト及び動物に対して安全に投与されるものである。医薬組成物の形態としては、注射用組成物、点滴用組成物、坐剤、経鼻剤、舌下剤、経皮吸収剤等が挙げられる。注射用組成物の場合は、本発明の破骨細胞形成抑制因子の薬理的有効量及び製薬学的に許容しうる担体の混合物であり、その中にはアミノ酸、糖類、セルロース誘導体、及びその他の有機／無機化合物等の一般的に注射用組成物に添加される賦形剤／賦活剤を用いることもできる。又、本発明の破骨細胞形成抑制因子とこれらの賦形剤／賦活剤を用い注射剤を調製する場合は、必要に応じてpH調整剤、緩衝剤、安定化剤、可溶化剤等を添加して常法によって各種注射剤とすることができる。

以下に実施例を挙げて本発明をより詳細に説明するが、これらは単に例示するのみであり、本発明はこれらにより限定されるものではない。

実施例 1

コスミドライブラリーの作製

ヒト胎盤ゲノムDNA(クローンテック社 ; Cat.No. 6550-2)とpWE15 コスミドベクター(ストラタジーン社)を用いてコスミドライブラリーを作製した。基本的には、ストラタジーン社のpWE15 コスミドベクターキットに添付されたプロトコールに従って実施したが、DNA、大腸菌、ファージを扱う一般的方法は、Molecular Cloning : A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory(1989))を参考にした。

(i) ヒト・ゲノムDNA 制限酵素分解物の調製

1.5ml のエッペンドルフチューブ 4 本 (チューブ A、B、C、D) に 10mM Tris-HCl、10mM MgCl₂、100mM NaCl を含む溶液 750 μ l に溶かしたヒト胎盤ゲノム DNA をそれぞれ 100 μ g 入れ、チューブ A には 0.2 ユニット、チューブ B には 0.4 ユニット、チューブ C には 0.6 ユニット、チューブ D には 0.8 ユニットの制限酵素 MboI を添加して 1 時間消化した。その後、それぞれのチューブに 20mM になるように EDTA を添加して反応を止め、フェノール/クロロホルム (1 : 1) で抽出し、水相に 2 倍量のエタノールを加えて DNA を沈殿させた。遠心分離で DNA を回収したあと、70% エタノールで洗い、それぞれのチューブの中の DNA を 100 μ l の TE に溶解した。4 本のチューブの DNA を 1 本にまとめ、68°C にて 10 分保温したのち室温に戻し、これを遠心管 (38 ml) の中で作製した 10% - 40% 直線状ショ糖密度勾配に重層した。ショ糖密度勾配は 20mM Tris-HCl (pH8.0)、5mM EDTA、1M NaCl を含む緩衝液のなかで作製した。この遠心管を日立製作所 SRP28SA ローターを用いて 20°C で 26,000rpm にて 24 時間遠心したのち、フラクションコレクターを用いてショ糖密度勾配を 0.4ml ずつのフラクションに分画した。各フラクションの一部を 0.4 % アガロース電気泳動にかけて DNA のサイズを確認したのち、およそ 30kb (キロベースペア) から 40kb の長さの DNA を含むフラクションを集め、糖濃度を 10% 以下になるよう TE で希釈したのちエタノールを 2.5 倍量加えて DNA を沈殿させた。DNA は TE (10mM HCl (pH8.0) + 1mM EDTA 緩衝液 (以下 TE という)) に溶解したのち 4°C で保存した。

(ii) コスミド・ベクターの準備

ストラタジーン社の pWE15 コスミドベクターをコスミドベクターキットに添付されたプロトコールに従って制限酵素 BamHI によって完全消化したのち、エタノール沈殿によって DNA を回収し、1mg/ml の濃度になるよう TE に溶解した。この DNA の 5' 末端のリン酸を子牛小腸アルカリ性フォスファターゼを用いて除いた後、フェノール抽出とエタノール沈殿によって DNA を回収し、1mg/ml の濃度になるよう TE に溶解した。

(iii) ゲノム DNA のベクターへのライゲーション及び in vitro パッケージング

1.5 μ g のサイズ分画したゲノム DNA と 3 μ g の制限酵素 BamHI で消化した pWE15 コスミドベクターをファルマシア社の Ready-To-Go T4DNA ライゲースを用いて 20 μ l の反応溶液中でライゲーションした。ライゲーションした DNA を、ギガバック II パッケージングエクストラクト（ストラタジーン社）を用い、プロトコールに従って in vitro パッケージングした。パッケージング反応後、反応液の一部を SM 緩衝液で段階的に希釈し、10mM MgCl₂ に懸濁した大腸菌 XL1-Blue MR（ストラタジーン社）と混合してファージを感染させたのち、50 μ g/ml のアンピシリンを含む LB アガープレートに蒔き、生ずるコロニーの数を計数した。この結果を基にパッケージング反応液 1 μ l 当たりのコロニー数を算出した。

(iv) コスミドライブラリーの作製

上記の方法で作製したパッケージング反応液と大腸菌 XL1-Blue MR を混合し、直径 15cm のアガロースプレート当たり 50,000 個のコロニーが生ずるようにアンピシリンを含むアガロースプレートに蒔いた。一夜 37°C でプレートを保温したのち、プレート一枚当たり 3ml の LB 培地を加えて大腸菌のコロニーを懸濁し、回収した。アガロースプレートをさらに 3ml の LB 培地で 1 回洗い、これを基の大腸菌懸濁液と合わせた。すべてのアガロースプレートから回収した大腸菌を一本の遠心管にまとめ、グリセロールを 20% となるように添加し、さらにアンピシリンを 50 μ g/ml となるように加えた。十分混合したのち一部を分取し、残りを -80°C に保

存した。分取した大腸菌を段階希釈してアガープレートに蒔き、1ml 当たりのコロニー数を算出した。

実施例 2

コスミドライブラリーのスクリーニングとコロニーの純化

50 μ g/ml のアンピシリンを含む直径15cmのLBアガロースプレートに直径14.2cm のニトロセルロースフィルター（ミリポア社）を乗せ、その上にプレート一枚当たり50,000個の大腸菌コロニーが生ずるようにコスミドライブラリーを蒔き、37℃にて一夜保温した。常法に従ってニトロセルロースフィルター上の大腸菌を別のニトロセルロースフィルターに転写してレプリカフィルターを2枚作製した。コスミドベクターキットに添付されたプロトコールに従い、レプリカフィルター上の大腸菌をアルカリ変成、中和し、ストラタリンカー（ストラタジーン社）を用いてDNA をニトロセルロースフィルター上に固定した。さらにこのフィルターを減圧オープン中で80℃で2 時間加熱した。このように処理したニトロセルロースフィルターを、ヒトOCIFcDNAの5' 末端と3' 末端から作製した2 種のDNA をプローブとしてハイブリダイズした。即ち、OCIFcDNAを含む大腸菌 pBK/OIF10（通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所寄託、受託番号FERM BP-5267）よりプラスミドを精製し、OCIFcDNAを含むプラスミドを制限酵素KpnIとEcoRI で消化し、生ずるフラグメントをアガロースゲルを用いて分離したのち、0.2kb のKpnI/EcoRIフラグメントをQIAEX IIゲルエクストラクションキット（キアゲン社）を用いて精製した。このDNA をメガプライムDNA ラベリングシステム（アマシャム社製）を用いて³²P で標識した（5'-DNAプローブ）。また別に、得られたプラスミドを制限酵素 BamHIと制限酵素 EcoRVで消化して生ずる0.2kb のBamHI/EcoRV フラグメントを同様に精製し、上記の方法で³²P 標識した（3'-DNAプローブ）。上記レプリカフィルターのうち一枚を5'-DNAプローブと、別の一枚を3'-DNAプローブとハイブリダイズした。コロニーハイブリダイゼーション及びフィルターの洗浄はコスミドベクターキットに添付されたプロトコールに述べられた方法に従っ

て行った。オートラジオグラフィーの結果それぞれのプローブで複数個の陽性シグナルが検出されたが、両方のプローブにハイブリダイズする陽性シグナルが一個検出された。このシグナルに相当するアガロースプレート上のコロニーを精製することにより純化したコロニーを単離した。純化されたコロニーから常法に従ってコスミドを精製しpWEOCIF と命名した。このコスミドに含まれるヒトゲノムDNA のサイズはおよそ38kbであった。

実施例 3

ヒトOCIFゲノムDNA の塩基配列の決定

(i) OCIF ゲノムDNA のサブクローニング

コスミドpWEOCIFを制限酵素EcoRIを用いて消化し、生じたフラグメントを 0.7 %アガロースゲルに供与して分離したのち、サザンブロット法によってDNA をナイロン膜 (Hybond-N、アマシャム社) に移し、ストラタリンカー (ストラタジーン社) を用いてDNA をナイロン膜に固定した。一方、プラスミドpBKOCIF を制限酵素EcoRI によって消化し、ヒトOCIFcDNAを含む1.6kb のフラグメントをアガロースゲルを用いて単離したのち、メガプライムDNA ラベリングシステム (アマシャム社) を用いて³²P 標識した。常法に従って上記ナイロン膜と³²P 標識した1.6kb のOCIFcDNAをハイブリダイズさせた結果、6kb 、4kb 、3.6kb 、2.6kbのDNA フラグメントがハイブリダイズすることがわかった。ヒトOCIFcDNAとハイブリダイズするこれらのフラグメントをアガロースゲルを用いて単離したのち、それぞれpBluescript II SK+ベクター (ストラタジーン社) のEcoRI サイトに常法に従ってサブクローニングし、得られたプラスミドをそれぞれpBSE6 、pBSE4 、pBSE3.6 、pBSE2.6 と命名した。

(ii) 塩基配列の決定

上記プラスミドにサブクローニングされたヒトOCIFゲノムDNA の塩基配列の決定にはABI ダイデオキシターミネーターサイクルシーケンシングレディリーアクションキット (パーキンエルマー社) と373 シーケンシングシステム (アプ

ライドバイオシステムズ社)を使用した。塩基配列決定用プライマーはヒトOCIF cDNAの塩基配列(配列表配列番号4)をもとに合成した。また、塩基配列が決定された部分をもとにしてさらにプライマーを合成した。決定された塩基配列を配列表配列番号1及び2に示す。配列番号1にはOCIF遺伝子の第1エクソンが含まれ、配列番号2には第2、第3、第4、第5エクソンが含まれる。第1エクソンと第2エクソンの間にはおよそ17kbのヌクレオチドが介在する。

実施例4

COS-7細胞による組み換え型OCIFの生産

(i) OCIFゲノムDNA発現コスミドの作製

OCIFゲノムDNAを動物細胞で発現させるために、コスミドベクターpWE15(ストラタジーン社)に発現プラスミドpcDL-SR α 296(Molecular and Cellular Biology, vol.8, p466-472, 1988)の発現ユニットを挿入した。まず、発現プラスミドpcDL-SR α 296を制限酵素SalIで消化してSR α プロモーター、SV40後期スプライス信号、ポリ(A)付加信号などを含む約1.7kbの発現ユニットを切り出し、アガロース電気泳動によって分離後、QIAEX IIゲルエクストラクションキット(キアゲン社)を用いて精製した。一方、コスミドベクターpWE15を制限酵素EcoRIで消化し、アガロース電気泳動によって分離後、8.2kbのpWE15 DNAをQIAEX IIゲルエクストラクションキット(キアゲン社)を用いて精製した。これら二つのDNA断片末端をDNAブランディングキット(宝酒造社)を用いて平滑化し、DNAライゲーションキット(宝酒造社)を用いて結合させ、大腸菌DH5 α (ギブコBRL社)に導入した。得られた形質転換株を増殖させ、発現ユニットを含む発現コスミドpWESR α をキアゲンカラム(キアゲン社)を用いて精製した。

前記(i)で得られた約38kbのOCIFゲノムDNAが挿入されたコスミドpWE0CIFを制限酵素NotIで消化して約38kbのOCIFゲノムDNAを切り出し、アガロース電気泳動によって分離後、QIAEX IIゲルエクストラクションキット(キアゲン社)を用いて精製した。一方、発現コスミドpWESR α を制限酵素EcoRIで消化し、フ

ェノール、クロロホルムで抽出した後、エタノール沈殿し、TEに溶解した。この制限酵素EcoRI で消化されたpWESR α とEcoRI-XmnI-NotI アダプター(#1105、#1156 ; ニューイングランドバイオラボ社)をT4 DNAリガーゼ(宝酒造社)を用いて結合し、アガロース電気泳動によってフリーのアダプターと分離後、QIAEX II ゲルエクストラクションキット(キアゲン社)を用いて精製した。制限酵素NotI で消化された約37kbのOCIFゲノムDNAとアダプターを付加したpWESR α をT4 DNAリガーゼ(宝酒造社)を用いて結合し、ギガパックIIパッケージングエクストラクト(ストラタジーン社)を用いてインヴィトロパッケージングを行い、大腸菌XL1-Blue MR (ストラタジーン社)に感染させた。得られた形質転換株を増殖させ、OCIFゲノムDNAが挿入された発現コスミドpWESR α OCIFをキアゲンカラム(キアゲン社)を用いて精製した。OCIF発現コスミドpWESR α OCIFをエタノールによって沈殿させた後、無菌蒸留水に溶解し以下の操作に用いた。

(ii)OCIFゲノムDNAのトランジェントな発現及びOCIF活性の測定

前記(i) で得られたOCIF発現コスミドpWESR α OCIFを用いて、以下に述べる方法で組み換え型OCIFを発現させ、その活性を測定した。 8×10^5 個のCOS-7 細胞(理化学研究所細胞開発銀行、RCB0539)を6ウェルプレートの各ウェルに10%牛胎児血清(ギブコBRL社)を含むDMEM培地(ギブコBRL社)を用いて植え込み、翌日、培地を除いた後、無血清DMEM培地で細胞を洗浄した。トランスフェクション用試薬リポフェクタミン(ギブコBRL社)添付のプロトコールに従い、あらかじめOPTI-MEM培地(ギブコBRL社)を用いて希釈しておいたOCIF発現コスミドpWESR α OCIFとリポフェクタミンを混合した後、この混合液を各ウェルの細胞に加えた。対照として発現コスミドpWESR α を用い、細胞に同様に加えた。用いたコスミドDNA及びリポフェクタミンの量はそれぞれ3 μ g 及び12 μ l であった。24時間後、培地を除き1.5ml の新しいEX-CELL301培地(JRH バイオサイエンス社)を加え、さらに48時間後、培地を回収し、これをOCIF活性測定用サンプルとした。OCIFの活性測定は久米川正好らの方法(蛋白質・核酸・

酵素 Vol.34, p999 (1989)) 及びTakahashi N. et.alの方法(Endocrinology vol.122, p1373 (1988)) に従い測定した。生後約17日のマウス骨髄細胞からの活性型ビタミンD₃存在下での破骨細胞形成を酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性の誘導で試験し、その抑制活性を測定し、破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質(OCIF)の活性とした。すなわち、96ウェルマイクロプレートの各ウェルに、 2×10^{-8} Mの活性型ビタミンD₃と10%牛胎児血清を含む α -MEM培地(ギブコBRL社)で希釈したサンプル 100 μ l を入れ、生後約17日のマウス骨髄細胞 3×10^5 個を 100 μ l の10%牛胎児血清を含む α -MEM培地に懸濁させて播種し、5% CO₂、37°C、湿度 100%にて一週間培養した。培養3日目と5日目に、培養液のうち 160 μ l を廃棄し、 1×10^{-8} M活性型ビタミンD₃及び10%牛胎児血清を含む α -MEM培地で希釈したサンプル 160 μ l を添加した。培養7日後に細胞をリン酸塩緩衝生理食塩水で洗浄した後エタノール/アセトン(1:1)溶液で細胞を室温にて1分間固定し、破骨細胞形成を酸性ホスファターゼ活性測定キット(Acid Phosphatase, Leucocyte, Cat.No.387-A; シグマ社)を用いた染色で検出した。酒石酸存在下での酸性ホスファターゼ活性陽性細胞の減少をOCIF活性とした。結果を表1に示す。この結果より、IMR-90の培養液から得られた天然型OCIF及びCHO細胞で生産した組み換え型OCIFと同様の活性を、この培養液が有することが確認された。

表 1

COS-7細胞で発現させた培養液中のOCIF活性

希釈率	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320
OCIF genomic DNA導入	++	++	++	++	+	-
ベクター導入	-	-	-	-	-	-
未処理	-	-	-	-	-	-

〔表中、++は破骨細胞形成が80%以上抑制される活性を、+は破骨細胞形成が30～80%抑制される活性を、-は活性が検出されないことを示す。〕

(iii) ウェスタンブロッティングによる生産物の確認

上記(ii)で得られたOCIF活性測定用サンプルを10 μ l 取り、10 μ l のSDS-PAGE用サンプルバッファー (0.5M Tris-HCl、20% グリセロール、4% SDS、20 μ g/mlブロムフェノールブルー、pH 6.8) を加えて100℃で3分間煮沸したのち、非還元状態で10%SDS ポリアクリルアミド電気泳動を行った。電気泳動後、セミドライブロッティング装置 (バイオラッド社) を用いて蛋白質をゲルからPVDFメンブレン (ProBlott、パーキンエルマー社) にブロッティングした。そのメンブレンをブロッキング後、先に得られたOCIF蛋白質を西洋ワサビパーオキシダーゼで常法により標識した西洋ワサビパーオキシダーゼ標識抗OCIF抗体とともに37℃で2時間保温した。洗浄後、ECL システム (アマシャム社) を用いて抗OCIF抗体が結合している蛋白質を検出した。第1図に示すようにpWESR α OCIFをトランスフェクトした COS-7細胞の培養上清からは、分子量約120キロダルトンと60キロダルトンの2本のバンドが検出された。一方、pWESR α ベクターのみをトランスフェクトしたCOS-7細胞の培養上清を同様の方法で解析した結果、120キロダルトンと60キロダルトンのバンドは検出されなかった。この結果より、得られた蛋白質はOCIFであることが確認された。

産業上の利用の可能性

本発明によると破骨細胞形成抑制活性を有する蛋白質OCIFをコードするゲノムDNA、及びそれを用いて遺伝子工学的手法により該蛋白質を製造する方法が提供される。本発明の遺伝子を発現させることにより得られる蛋白質は、破骨細胞形成抑制活性を有し、骨粗鬆症などの骨量減少症、リウマチ又は変形性関節症などの骨代謝異常疾患、あるいは多発性骨髄腫瘍などの骨代謝異常疾患の治療及び

改善を目的とした医薬組成物として、あるいはこのような疾患の免疫学的診断を確立するための抗原として有用である。

微生物への言及

寄託機関：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

住 所：日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号

寄託日：平成7年6月21日

（平成7年6月21日に原寄託され、平成7年10月25日にブダ
ペスト条約に基づく国際寄託へ移管）

受託番号：FERM BP-5267

1 5

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 1 3 1 6

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 2

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : genomic DNA (ヒトOCIFゲノムDNA-1)

配列 :

CTGGAGACAT	ATAACTTGAA	CACTTGGCCC	TGATGGGGAA	GCAGCTCTGC	AGGGACTTTT	60
TCAGCCATCT	GTAAACAATT	TCAGTGGCAA	CCCGCGAACT	GTAATCCATG	AATGGGACCA	120
CACTTTACAA	GTCATCAAGT	CTAACTTCTA	GACCAGGGAA	TTAATGGGGG	AGACAGCGAA	180
CCCTAGAGCA	AAGTGCCAAA	CTTCTGTGCA	TAGCTTGAGG	CTAGTGGAAA	GACCTCGAGG	240
AGGCTACTCC	AGAAGTTCAG	CGCGTAGGAA	GCTCCGATAC	CAATAGCCCT	TTGATGATGG	300
TGGGGTTGGT	GAAGGGAACA	GTGCTCCGCA	AGGTTATCCC	TGCCCCAGGC	AGTCCAATTT	360
TCACTCTGCA	GATTCTCTCT	GGCTCTAACT	ACCCAGATA	ACAAGGAGTG	AATGCAGAAT	420
AGCACGGGCT	TTAGGGCCAA	TCAGACATTA	GTTAGAAAAA	TTCCTACTAC	ATGGTTTATG	480
TAAACTTGAA	GATGAATGAT	TGCGAACTCC	CCGAAAAGGG	CTCAGACAAT	GCCATGCATA	540
AAGAGGGGCC	CTGTAATTTG	AGGTTTCAGA	ACCCGAAGTG	AAGGGGTCAG	GCAGCCGGGT	600
ACGGCGGAAA	CTCACAGCTT	TCGCCCAGCG	AGAGGACAAA	GGTCTGGGAC	AACTCCAAC	660
TGCGTCCGGA	TCTTGGCTGG	ATCGGACTCT	CAGGGTGGAG	GAGACACAAG	CACAGCAGCT	720
GCCCAGCGTG	TGCCCAGCCC	TCCCACCGCT	GGTCCCGGCT	GCCAGGAGGC	TGGCCGCTGG	780
CGGGAAGGGG	CCGGGAAACC	TCAGAGCCCC	GCGGAGACAG	CAGCCGCCTT	GTTCCCTCAGC	840
CCGGTGGCTT	TTTTTTCCCC	TGCTCTCCCA	GGGACAGAC	ACCACCGCCC	CACCCCTCAC	900
GCCCCACCTC	CCTGGGGGAT	CCTTTCCGCC	CCAGCCCTGA	AAGCGTTAAT	CCTGGAGCTT	960
TCTGCACACC	CCCCGACCGC	TCCCGCCCAA	GCTTCCTAAA	AAAGAAAGGT	GCAAAGTTTG	1020
GTCCAGGATA	GAAAAATGAC	TGATCAAAGG	CAGGCGATAC	TTCCTGTTGC	CGGGACGCTA	1080
TATATAACGT	GATGAGCGCA	CGGGCTGCGG	AGACGCACCG	GAGCGCTCGC	CCAGCCGCCG	1140

1 6

CCTCCAAGCC CCTGAGGTTT CCGGGGACCA CA ATG AAC AAG TTG CTG TGC TGC 1193

Met Asn Lys Leu Leu Cys Cys

-20

-15

GCG CTC GTG GTAAGTCCCT GGGCCAGCCG ACGGGTGCCC GGCGCCTGGG 1242

Ala Leu Val

GAGGCTGCTG CCACCTGGTC TCCCAACCTC CCAGCGGACC GGCGGGGAGA AGGCTCCACT 1302

CGCTCCCTCC CAGG 1316

配列番号 : 2

配列の長さ : 9 8 9 8

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 2

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : genomic DNA (ヒトOCIFゲノムDNA - 2)

配列 :

GCTTACTTTG TGCCAAATCT CATTAGGCTT AAGGTAATAC AGGACTTTGA GTCAAATGAT 60

ACTGTTGCAC ATAAGAACAA ACCTATTTTC ATGCTAAGAT GATGCCACTG TGTTCCCTTC 120

TCCTTCTAG TTT CTG GAC ATC TCC ATT AAG TGG ACC ACC CAG GAA ACG TTT 171

Phe Leu Asp Ile Ser Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe

-10

-5

1

CCT CCA AAG TAC CTT CAT TAT GAC GAA GAA ACC TCT CAT CAG CTG TTG 219

Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu

5

10

15

TGT GAC AAA TGT CCT CCT GGT ACC TAC CTA AAA CAA CAC TGT ACA GCA 267
 Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala
 20 25 30 35

AAG TGG AAG ACC GTG TGC GCC CCT TGC CCT GAC CAC TAC TAC ACA GAC 315
 Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp
 40 45 50

AGC TGG CAC ACC AGT GAC GAG TGT CTA TAC TGC AGC CCC GTG TGC AAG 363
 Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys
 55 60 65

GAG CTG CAG TAC GTC AAG CAG GAG TGC AAT CGC ACC CAC AAC CGC GTG 411
 Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val
 70 75 80

TGC GAA TGC AAG GAA GGG CGC TAC CTT GAG ATA GAG TTC TGC TTG AAA 459
 Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys
 85 90 95

CAT AGG AGC TGC CCT CCT GGA TTT GGA GTG GTG CAA GCT G GTACGTGTCA 509
 His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala
 100 105 110

ATGTGCAGCA AAATTAATTA GGATCATGCA AAGTCAGATA GTTGTGACAG TTTAGGAGAA 569

CACTTTTGTT CTGATGACAT TATAGGATAG CAAATTGCAA AGGTAATGAA ACCTGCCAGG 629
TAGGTACTAT GTGTCTGGAG TGCTTCCAAA GGACCATTGC TCAGAGGAAT ACTTTGCCAC 689
TACAGGGCAA TTTAATGACA AATCTCAAAT GCAGCAAATT ATTCTCTCAT GAGATGCATG 749
ATGGTTTTTT TTTTTTTTTT TAAAGAAACA AACTCAAGTT GCACTATTGA TAGTTGATCT 809
ATACCTCTAT ATTTCACTTC AGCATGGACA CCTTCAAACCT GCAGCACTTT TTGACAAACA 869
TCAGAAATGT TAATTTATAC CAAGAGAGTA ATTATGCTCA TATTAATGAG ACTCTGGAGT 929
GCTAACAATA AGCAGTTATA ATTAATTATG TAAAAAATGA GAATGGTGAG GGGAATTGCA 989
TTTCATTATT AAAACAAGG CTAGTTCTTC CTTTAGCATG GGAGCTGAGT GTTTGGGAGG 1049
GTAAGGACTA TAGCAGAATC TCTTCAATGA GCTTATTCTT TATCTTAGAC AAAACAGATT 1109
GTCAAGCCAA GAGCAAGCAC TTGCCTATAA ACCAAGTGCT TTCTCTTTTG CATTTTGAAC 1169
AGCATTGGTC AGGGCTCATG TGTATTGAAT CTTTAAACC AGTAACCCAC GTTTTTTTTC 1229
TGCCACATTT GCGAAGCTTC AGTGCAGCCT ATAACTTTTC ATAGCTTGAG AAAATTAAGA 1289
GTATCCACTT ACTTAGATGG AAGAAGTAAT CAGTATAGAT TCTGATGACT CAGTTTGAAG 1349
CAGTGTTTCT CAACTGAAGC CCTGCTGATA TTTAAGAAA TATCTGGATT CCTAGGCTGG 1409
ACTCCTTTTT GTGGGCAGCT GTCCTGCGCA TTGTAGAATT TTGGCAGCAC CCCTGGACTC 1469
TAGCCACTAG ATACCAATAG CAGTCCTTCC CCCATGTGAC AGCCAAAAAT GTCTTCAGAC 1529
ACTGTCAAAT GTCGCCAGGT GGCAAAATCA CTCCTGGTTG AGAACAGGGT CATCAATGCT 1589
AAGTATCTGT AACTATTTTA ACTCTCAAAA CTTGTGATAT ACAAAGTCTA AATTATTAGA 1649
CGACCAATAC TTTAGGTTTA AAGGCATACA AATGAAACAT TCAAAAATCA AAATCTATTC 1709
TGTTTCTCAA ATAGTGAATC TTATAAAATT AATCACAGAA GATGCAAATT GCATCAGAGT 1769
CCCTTAAAAT TCCTCTTCGT ATGAGTATTT GAGGGAGGAA TTGGTGATAG TTCCTACTTT 1829
CTATTGGATG GTACTTTGAG ACTCAAAGC TAAGCTAAGT TGTGTGTGTG TCAGGGTGCG 1889
GGGTGTGGAA TCCCATCAGA TAAAAGCAAA TCCATGTAAT TCATTCAGTA AGTTGTATAT 1949
GTAGAAAAAT GAAAAGTGGG CTATGCAGCT TGGAACTAG AGAATTTTGA AAAATAATGG 2009
AAATCACAAG GATCTTTCTT AAATAAGTAA GAAATCTGT TTGTAGAATG AAGCAAGCAG 2069
GCAGCCAGAA GACTCAGAAC AAAAGTACAC ATTTTACTCT GTGTACACTG GCAGCACAGT 2129

GGGATTTATT TACCTCTCCC TCCCTAAAAA CCCACACAGC GGTTCCTCTT GGGAAATAAG 2189
AGGTTTCCAG CCCAAAGAGA AGGAAAGACT ATGTGGTGT ACTCTAAAAA GTATTTAATA 2249
ACCGTTTTGT TGTTGCTGTT GCTGTTTTGA AATCAGATTG TCTCCTCTCC ATATTTTATT 2309
TACTTCATTC TGTTAATTCC TGTGGAATTA CTTAGAGCAA GCATGGTGAA TTCTCAACTG 2369
TAAAGCCAAA TTTCTCCATC ATTATAATTT CACATTTTGC CTGGCAGGTT ATAATTTTTTA 2429
TATTTCCACT GATAGTAATA AGGTAAAATC ATTACTTAGA TGGATAGATC TTTTTCATAA 2489
AAAGTACCAT CAGTTATAGA GGGAAGTCAT GTTCATGTTC AGGAAGGTCA TTAGATAAAG 2549
CTTCTGAATA TATTATGAAA CATTAGTTCT GTCATTCTTA GATTCTTTTT GTTAAATAAC 2609
TTTAAAAGCT AACTTACCTA AAAGAAATAT CTGACACATA TGAAGTTCTC ATTAGGATGC 2669
AGGAGAAGAC CCAAGCCACA GATATGTATC TGAAGAATGA ACAAGATTCT TAGGCCCCGC 2729
ACGGTGGCTC ACATCTGTAA TCTCAAGAGT TTGAGAGGTC AAGGCGGGCA GATCACCTGA 2789
GGTCAGGAGT TCAAGACCAG CCTGGCCAAC ATGATGAAAC CCTGCCTCTA CTAAAAATAC 2849
AAAAATTAGC AGGGCATGGT GGTGCATGCC TGCAACCCTA GCTACTCAGG AGGCTGAGAC 2909
AGGAGAATCT CTTGAACCTT CGAGGCGGAG GTTGTGGTGA GCTGAGATCC CTCTACTGCA 2969
CTCCAGCCTG GGTGACAGAG ATGAGACTCC GTCCCTGCCG CCGCCCCCGC CTTCCCCCCC 3029
AAAAAGATTC TTCTTCATGC AGAACATACG GCAGTCAACA AAGGGAGACC TGGGTCCAGG 3089
TGTCCAAGTC ACTTATTTTG AGTAAATTAG CAATGAAAGA ATGCCATGGA ATCCCTGCCC 3149
AAATACCTCT GCTTATGATA TTGTAGAATT TGATATAGAG TTGTATCCCA TTTAAGGAGT 3209
AGGATGTAGT AGGAAAGTAC TAAAAACAAA CACACAAACA GAAAACCCTC TTTGCTTTGT 3269
AAGGTGGTTC CTAAGATAAT GTCAGTGCAA TGCTGGAAAT AATATTTAAT ATGTGAAGGT 3329
TTTAGGCTGT GTTTTCCCTT CCTGTTCTTT TTTTCTGCCA GCCCTTTGTC ATTTTTCAG 3389
GTCAATGAAT CATGTAGAAA GAGACAGGAG ATGAAACTAG AACCAGTCCA TTTTGCCCCCT 3449
TTTTTTATTT TCTGGTTTTG GTAAAAGATA CAATGAGGTA GGAGGTGAG ATTTATAAAT 3509
GAAGTTTAAT AAGTTTCTGT AGCTTTGATT TTTCTCTTTC ATATTTGTTA TCTTGCATAA 3569
GCCAGAATTG GCCTGTAAAA TCTACATATG GATATTGAAG TCTAAATCTG TTCAACTAGC 3629
TTACACTAGA TGGAGATATT TTCATATTCA GATACACTGG AATGTATGAT CTAGCCATGC 3689

2 0

GTAATATAGT CAAGTGTTTG AAGGTATTTA TTTTAAATAG CGTCTTTAGT TGTGGACTGG 3749
TTCAAGTTTT TCTGCCAATG ATTTCTTCAA ATTTATCAAA TATTTTTCCTA TCATGAAGTA 3809
AAATGCCCTT GCAGTCACCC TTCCTGAAGT TTGAACGACT CTGCTGTTTT AAACAGTTTA 3869
AGCAAATGGT ATATCATCTT CCGTTTACTA TGTAAGCTTAA CTGCAGGCTT ACGCTTTTGA 3929
GTCAGCGGCC AACTTTATTG CCACCTTCAA AAGTTTATTA TAATGTTGTA AATTTTACT 3989
TCTCAAGGTT AGCATACTTA GGAGTTGCTT CACAATTAGG ATTCAGGAAA GAAAGAACTT 4049
CAGTAGGAAC TGATTGGAAT TTAATGATGC AGCATTCAAT GGGTACTAAT TTCAAAGAAT 4109
GATATTACAG CAGACACACA GCAGTTATCT TGATTTTCTA GGAATAATTG TATGAAGAAT 4169
ATGGCTGACA ACACGGCCTT ACTGCCACTC AGCGGAGGCT GGACTAATGA ACACCCTACC 4229
CTTCTTTCCT TTCCTCTCAC ATTTTCATGAG CGTTTTGTAG GTAACGAGAA AATTGACTTG 4289
CATTTGCATT ACAAGGAGGA GAAACTGGCA AAGGGGATGA TGGTGGAAGT TTTGTTCTGT 4349
CTAATGAAGT GAAAAATGAA AATGCTAGAG TTTTGTGCAA CATAATAGTA GCAGTAAAAA 4409
CCAAGTGAAA AGTCTTTCCA AAAGTGTGTT AAGAGGGCAT CTGCTGGGAA ACGATTTGAG 4469
GAGAAGGTAC TAAATTGCTT GGTATTTTCC GTAG GA ACC CCA GAG CGA AAT ACA 4523

Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr

115

GTT TGC AAA AGA TGT CCA GAT GGG TTC TTC TCA AAT GAG ACG TCA TCT 4571
Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser
120 125 130 135

AAA GCA CCC TGT AGA AAA CAC ACA AAT TGC AGT GTC TTT GGT CTC CTG 4619
Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu
140 145 150

CTA ACT CAG AAA GGA AAT GCA ACA CAC GAC AAC ATA TGT TCC GGA AAC 4667

2 1

Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn

155

160

165

AGT GAA TCA ACT CAA AAA TGT GGA ATA G GTAATTACAT TCCAAAATAC 4715

Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys Gly Ile

170

175

GTCTTTGTAC GATTTTGTAG TATCATCTCT CTCTCTGAGT TGAACACAAG GCCTCCAGCC 4775
ACATTCTTGG TCAAACCTTAC ATTTTCCCTT TCTTGAATCT TAACCAGCTA AGGCTACTCT 4835
CGATGCATTA CTGCTAAAGC TACCACTCAG AATCTCTCAA AAACCTCATCT TCTCACAGAT 4895
AACACCTCAA AGCTTGATTT TCTCTCCTTT CACACTGAAA TCAAATCTTG CCCATAGGCA 4955
AAGGGCAGTG TCAAGTTTGC CACTGAGATG AAATTAGGAG AGTCCAAACT GTAGAATTCA 5015
CGTTGTGTGT TATTACTTTC ACGAATGTCT GTATTATTAA CTAAAGTATA TATTGGCAAC 5075
TAAGAAGCAA AGTGATATAA ACATGATGAC AAATTAGGCC AGGCATGGTG GCTTACTCCT 5135
ATAATCCCAA CATTTTGGGG GGCCAAGGTA GGCAGATCAC TTGAGGTCAG GATTTCAAGA 5195
CCAGCCTGAC CAACATGGTG AAACCTTGTC TCTACTAAAA ATACAAAAAT TAGCTGGGCA 5255
TGGTAGCAGG CACTTCTAGT ACCAGCTACT CAGGGCTGAG GCAGGAGAAT CGCTTGAACC 5315
CAGGAGATGG AGGTTGCAGT GAGCTGAGAT TGTACCACTG CACTCCAGTC TGGGCAACAG 5375
AGCAAGATTT CATCACACAC ACACACACAC ACACACACAC ACACATTAGA AATGTGTACT 5435
TGGCTTTGTT ACCTATGGTA TTAGTGATC TATTGCATGG AACTTCCAAG CTACTCTGGT 5495
TGTGTTAAGC TCTTCATTGG GTACAGGTCA CTAGTATTAA GTTCAGGTTA TTCGGATGCA 5555
TTCCACGGTA GTGATGACAA TTCATCAGGC TAGTGTGTGT GTTCACCTTG TCACTCCCAC 5615
CACTAGACTA ATCTCAGACC TTCACTCAAA GACACATTAC ACTAAAGATG ATTTGCTTTT 5675
TTGTGTTTAA TCAAGCAATG GTATAAACCA GCTTGACTCT CCCCAAACAG TTTTTCGTAC 5735
TACAAAGAAG TTTATGAAGC AGAGAAATGT GAATTGATAT ATATATGAGA TTCTAACCCA 5795
GTTCCAGCAT TGTTTCATTG TGTAATTGAA ATCATAGACA AGCCATTTTA GCCTTTGCTT 5855

2 2

TCTTATCTAA AAAAAAAAAA AAAAAAATGA AGGAAGGGGT ATTAAAAGGA GTGATCAAAT 5915
TTTAACATTC TCTTTAATTA ATTCATTTTT AATTTTACTT TTTTTCATTT ATTGTGCACT 5975
TACTATGTGG TACTGTGCTA TAGAGGCTTT AACATTTATA AAAACACTGT GAAAGTTGCT 6035
TCAGATGAAT ATAGGTAGTA GAACGGCAGA ACTAGTATTC AAAGCCAGGT CTGATGAATC 6095
CAAAAACAAA CACCCATTAC TCCCATTTTC TGGGACATAC TTACTCTACC CAGATGCCTCT 6155
GGGCTTTGTA ATGCCTATGT AAATAACATA GTTTTATGTT TGGTTATTTT CCTATGTAAT 6215
GTCTACTTAT ATATCTGTAT CTATCTCTTG CTTTGTTCCT AAAGGTAAAC TATGTGTCTA 6275
AATGTGGGCA AAAAATAACA CACTATTCCA AATTACTGTT CAAATTCCTT TAAGTCAGTG 6335
ATAATTATTT GTTTTGACAT TAATCATGAA GTTCCCTGTG GGTACTAGGT AAACCTTTAA 6395
TAGAATGTTA ATGTTTGTAT TCATTATAAG AATTTTGGC TGTTACTTAT TTACAACAAT 6455
ATTTCACTCT AATTAGACAT TTAATAAAT TTCTCTTGAA AACAATGCCC AAAAAAGAAC 6515
ATTAGAAGAC ACGTAAGCTC AGTTGGTCTC TGCCACTAAG ACCAGCCAAC AGAAGCTTGA 6575
TTTTATTCAA ACTTTGCATT TTAGCATATT TTATCTTGA AAATTCAATT GTGTTGGTTT 6635
TTTGTTTTTG TTTGTATTGA ATAGACTCTC AGAAATCCAA TTGTTGAGTA AATCTTCTGG 6695
GTTTTCTAAC CTTTCTTTAG AT GTT ACC CTG TGT GAG GAG GCA TTC TTC AGG 6747

Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg

180

185

TTT GCT GTT CCT ACA AAG TTT ACG CCT AAC TGG CTT AGT GTC TTG GTA 6795
Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val

190

195

200

GAC AAT TTG CCT GGC ACC AAA GTA AAC GCA GAG AGT GTA GAG AGG ATA 6843
Asp Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile

205

210

215

2 3

AAA CGG CAA CAC AGC TCA CAA GAA CAG ACT TTC CAG CTG CTG AAG TTA 6891

Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu

220

225

230

235

TGG AAA CAT CAA AAC AAA GAC CAA GAT ATA GTC AAG AAG ATC ATC CAA G 6940

Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln

240

245

250

GTATGATAAT CTAAAATAAA AAGATCAATC AGAAATCAAA GACACCTATT TATCATAAAC 7000

CAGGAACAAG ACTGCATGTA TGTTTAGTTG TGTGGATCTT GTTTCCTGT TGGAATCATT 7060

GTTGGACTGA AAAAGTTTCC ACCTGATAAT GTAGATGTGA TTCCACAAAC AGTTATACAA 7120

GGTTTTGTTC TCACCCCTGC TCCCCAGTTT CCTTGTAAG TATGTTGAAC ACTCTAAGAG 7180

AAGAGAAATG CATTTGAAGG CAGGGCTGTA TCTCAGGGAG TCGCTTCCAG ATCCCTTAAC 7240

GCTTCTGTAA GCAGCCCCTC TAGACCACCA AGGAGAAGCT CTATAACCAC TTTGTATCTT 7300

ACATTGCACC TCTACCAAGA AGCTCTGTTG TATTTACTTG GTAATTCTCT CCAGGTAGGC 7360

TTTTTCGTAGC TTACAAATAT GTTCTTATTA ATCCTCATGA TATGGCCTGC ATTAAAATTA 7420

TTTTAATGGC ATATGTTATG AGAATTAATG AGATAAAATC TGAAAAGTGT TTGAGCCTCT 7480

TGTAGGAAAA AGCTAGTTAC AGCAAAATGT TCTCACATCT TATAAGTTTA TATAAAGATT 7540

CTCCTTTAGA AATGGTGTGA GAGAGAAACA GAGAGAGATA GGGAGAGAAG TGTGAAAGAA 7600

TCTGAAGAAA AGGAGTTTCA TCCAGTGTGG ACTGTAAGCT TTACGACACA TGATGGAAAG 7660

AGTTCTGACT TCAGTAAGCA TTGGGAGGAC ATGCTAGAAG AAAAAGGAAG AAGAGTTTCC 7720

ATAATGCAGA CAGGGTCAGT GAGAAATTCA TTCAGGTCCT CACCAGTAGT TAAATGACTG 7780

TATAGTCTTG CACTACCCTA AAAAATTCA AGTATCTGAA ACCGGGGCAA CAGATTTTAG 7840

GAGACCAACG TCTTTGAGAG CTGATTGCTT TTGCTTATGC AAAGAGTAAA CTTTATGTT 7900

TTGAGCAAAC CAAAAGTATT CTTTGAACGT ATAATTAGCC CTGAAGCCGA AAGAAAAGAG 7960

AAAATCAGAG ACCGTTAGAA TTGGAAGCAA CCAAATTCCT TATTTTATAA ATGAGGACAT 8020

2 4

TTTAACCCAG AAAGATGAAC CGATTTGGCT TAGGGCTCAC AGATACTAAG TGA CT CATGT 8080
CATTAA TAGA AATGTTAGTT CCTCCCTCTT AGGTTTGTAC CCTAGCTTAT TACTGAAATA 8140
TTCTCTAGGC TGTGTGTCTC CTTTAGTTCC TCGACCTCAT GTCTTTGAGT TTTCAGATAT 8200
CCTCCTCATG GAGGTAGTCC TCTGGTGCTA TGTGTATTCT TTAAAGGCTA GTTACGGCAA 8260
TTAACTTATC AACTAGCGCC TACTAATGAA ACTTTGTATT ACAAAGTAGC TAACTTGAAT 8320
ACTTTCCTTT TTTTCTGAAA TGTTATGGTG GTAATTTCTC AAAC TTTTTC TTAGAAA ACT 8380
GAGAGTGATG TGTCTTATTT TCTACTGTTA ATTTTCAAAA TTAGGAGCTT CTTCCAAAGT 8440
TTTGTTGGAT GCCAAAAATA TATAGCATAT TATCTTATTA TAACAAAAAA TATTTATCTC 8500
AGTTCTTAGA AATAAATGGT GTCACTTAAC TCCCTCTCAA AAGAAAAGGT TATCATTGAA 8560
ATATAATTAT GAAATTCTGC AAGAACCTTT TGCCTCACGC TTGTTTTATG ATGGCATTGG 8620
ATGAATATAA ATGATGTGAA CACTTATCTG GGCTTTTGCT TTATGCAG AT ATT GAC 8676

Asp Ile Asp

CTC TGT GAA AAC AGC GTG CAG CGG CAC ATT GGA CAT GCT AAC CTC ACC 8724
Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala Asn Leu Thr
255 260 265 270

TTC GAG CAG CTT CGT AGC TTG ATG GAA AGC TTA CCG GGA AAG AAA GTG 8772
Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val
275 280 285

GGA GCA GAA GAC ATT GAA AAA ACA ATA AAG GCA TGC AAA CCC AGT GAC 8820
Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp
290 295 300

CAG ATC CTG AAG CTG CTC AGT TTG TGG CGA ATA AAA AAT GGC GAC CAA 8868

2 5

Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln

305

310

315

GAC ACC TTG AAG GGC CTA ATG CAC GCA CTA AAG CAC TCA AAG ACG TAC 8916

Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr

320

325

330

CAC TTT CCC AAA ACT GTC ACT CAG AGT CTA AAG AAG ACC ATC AGG TTC 8964

His Phe Pro Lys Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe

335

340

345

350

CTT CAC AGC TTC ACA ATG TAC AAA TTG TAT CAG AAG TTA TTT TTA GAA 9012

Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu

355

360

365

ATG ATA GGT AAC CAG GTC CAA TCA GTA AAA ATA AGC TGC TTA 9054

Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu

370

375

380

TAACTGGAAA TGGCCATTGA GCTGTTTCCT CACAATTGGC GAGATCCCAT GGATGAGTAA 9114

ACTGTTTCTC AGGCACTTGA GGCTTTCAGT GATATCTTTC TCATTACCAG TGACTAATTT 9174

TGCCACAGGG TACTAAAAGA AACTATGATG TGGAGAAAGG ACTAACATCT CCTCCAATAA 9234

ACCCCAAATG GTTAATCCAA CTGTCAGATC TGGATCGTTA TCTACTGACT ATATTTTCCC 9294

TTATTACTGC TTGCAGTAAT TCAACTGGAA ATTAAAAAAA AAAAACTAGA CTCCACTGGG 9354

CCTTACTAAA TATGGGAATG TCTAACTTAA ATAGCTTTGG GATTCCAGCT ATGCTAGAGG 9414

CTTTTATTAG AAAGCCATAT TTTTCTGT AAAAGTTACT AATATATCTG TAACACTATT 9474

ACAGTATTGC TATTTATATT CATTCAAGATA TAAGATTTGG ACATATTATC ATCCTATAAA 9534
 GAAACGGTAT GACTTAATTT TAGAAAGAAA ATTATATTCT GTTTATTATG ACAAATGAAA 9594
 GAGAAAATAT ATATTTTAA TGGAAAGTTT GTAGCATTTT TCTAATAGGT ACTGCCATAT 9654
 TTTTCTGTGT GGAGTATTTT TATAATTTTA TCTGTATAAG CTGTAATATC ATTTTATAGA 9714
 AAATGCATTA TTTAGTCAAT TGTTTAATGT TGGAAAACAT ATGAAATATA AATTATCTGA 9774
 ATATTAGATG CTCTGAGAAA TTGAATGTAC CTTATTTAAA AGATTTTATG GTTTTATAAC 9834
 TATATAAATG ACATTATTAA AGTTTTCAAA TTATTTTSTA TTGCTTTCTC TGTGCTTTT 9894
 ATTT 9898

配列番号 : 3

配列の長さ : 4 0 1

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 蛋白質

配列 :

Met	Asn	Asn	Leu	Leu	Cys	Cys	Ala	Leu	Val	Phe	Leu	Asp	Ile	Ser
-20					-15					-10				
Ile	Lys	Trp	Thr	Thr	Gln	Glu	Thr	Phe	Pro	Pro	Lys	Tyr	Leu	His
-5					1					5				
Tyr	Asp	Glu	Glu	Thr	Ser	His	Gln	Leu	Leu	Cys	Asp	Lys	Cys	Pro
10					15					20				
Pro	Gly	Thr	Tyr	Leu	Lys	Gln	His	Cys	Thr	Ala	Lys	Trp	Lys	Thr
25					30					35				
Val	Cys	Ala	Pro	Cys	Pro	Asp	His	Tyr	Tyr	Thr	Asp	Ser	Trp	His
40					45					50				

2 7

Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu

55 60 65

Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys

70 75 80

Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys

85 90 95

His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala Gly Thr

100 105 110

Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe

115 120 125

Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn

130 135 140

Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr

145 150 155

His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys

160 165 170

Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala

175 180 185

Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp

190 195 200

Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile

205 210 215

Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys

220 225 230

Leu Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile

235 240 245

2 8

Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile		
250	255	260
Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu		
265	270	275
Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr		
280	285	290
Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser		
295	300	305
Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu		
310	315	320
Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr		
325	330	335
Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe Leu His Ser Phe		
340	345	350
Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly		
355	360	365
Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu		
370	375	380

配列番号 : 4

配列の長さ : 1 2 0 6

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 1

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

配列 :

ATGAACAAC T GCTGTGCTG CGCGCTCGTG TTTCTGGACA TCTCCATTAA GTGGACCACC 60
CAGGAAACGT TTCCTCCAAA GTACCTTCAT TATGACGAAG AAACCTCTCA TCAGCTGTTG 120
TGTGACAAAT GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAACACT GTACAGCAAA GTGGAAGACC 180
GTGTGCGCCC CTTGCCCTGA CCACTACTAC ACAGACAGCT GGCACACCAG TGACGAGTGT 240
CTATACTGCA GCCCCGTGTG CAAGGAGCTG CAGTACGTCA AGCAGGAGTG CAATCGCACC 300
CACAACCGCG TGTGCGAATG CAAGGAAGGG CGCTACCTTG AGATAGAGTT CTGCTTGAAA 360
CATAGGAGCT GCCCTCCTGG ATTTGGAGTG GTGCAAGCTG GAACCCCAAG GCGAAATACA 420
GTTTGCAAAA GATGTCCAGA TGGGTTCTTC TCAAATGAGA CGTCATCTAA AGCACCTGT 480
AGAAAACACA CAAATTGCAG TGTCTTTGGT CTCCTGCTAA CTCAGAAAGG AAATGCAACA 540
CACGACAACA TATGTTCCGG AAACAGTGAA TCAACTCAAA AATGTGGAAT AGATGTTACC 600
CTGTGTGAGG AGGCATTCTT CAGGTTTGCT GTTCCTACAA AGTTTACGCC TAACTGGCTT 660
AGTGTCTTGG TAGACAATTT GCCTGGCACC AAAGTAAACG CAGAGAGTGT AGAGAGGATA 720
AAACGGCAAC ACAGCTCACA AGAACAGACT TTCCAGCTGC TGAAGTTATG GAAACATCAA 780
AACAAAGACC AAGATATAGT CAAGAAGATC ATCCAAGATA TTGACCTCTG TGAAAACAGC 840
GTGCAGCGGC ACATTGGACA TGCTAACCTC ACCTTCGAGC AGCTTCGTAG CTTGATGGAA 900
AGCTTACCGG GAAAGAAAGT GGGAGCAGAA GACATTGAAA AAACAATAAA GGCATGCAAA 960
CCCAGTGACC AGATCCTGAA GCTGCTCAGT TTGTGGCGAA TAAAAAATGG CGACCAAGAC 1020
ACCTTGAAGG GCCTAATGCA CGCACTAAAG CACTCAAAGA CGTACCACTT TCCCAAACT 1080
GTCACTCAGA GTCTAAAGAA GACCATCAGG TTCCTTCACA GCTTCACAAT GTACAAATTG 1140
TATCAGAAGT TATTTTTAGA AATGATAGGT AACCAGGTCC AATCAGTAAA AATAAGCTGC 1200
TTATAA 1206

請 求 の 範 囲

1. 配列表配列番号 1 及び 2 の塩基配列を含む DNA。
2. 配列番号 1 には OCIF 遺伝子の第 1 エクソンが含まれ、配列番号 2 には第 2、第 3、第 4、第 5 エクソンが含まれ、且つ、第 1 エクソンと第 2 エクソンの間におよそ 17kb のヌクレオチドが介在する、クレーム 1 に記載の DNA。
3. 次の物理化学的性質をもち、破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性のある蛋白質。
 - (a) 分子量 (SDS-PAGE による);
 - (i) 還元条件下で約 60kD
 - (ii) 非還元条件下で約 60kD 及び約 120kD
 - (b) アミノ酸配列;
配列表配列番号 3 のアミノ酸配列を有する。
 - (c) 親和性;
陽イオン交換体及びヘパリンに親和性を有する。
 - (d) 熱安定性;
 - (i) 70℃、10 分間または 56℃、30 分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が低下する。
 - (ii) 90℃、10 分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が失われる。
4. 配列表配列番号 1 及び 2 の塩基配列を含む DNA を発現ベクターに挿入して次の物理化学的性質をもち、破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性のある蛋白質を発現することのできるベクターを作成し、これを用いて遺伝子工学的手法により該蛋白質を製造することを特徴とする破骨細胞の分化及び／又は成熟抑制活性のある蛋白質の製造法。
 - (a) 分子量 (SDS-PAGE による);

(i) 還元条件下で約60kD

(ii) 非還元条件下で約60kD及び約120kD

(b) アミノ酸配列;

配列表配列番号3のアミノ酸配列を有する。

(c) 親和性;

陽イオン交換体及びヘパリンに親和性を有する。

(d) 熱安定性;

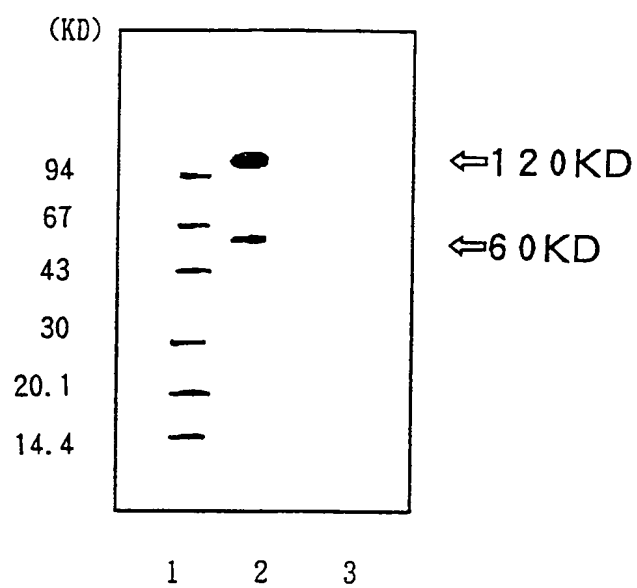
(i) 70℃、10分間または56℃、30分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が低下する。

(ii) 90℃、10分間の加熱処理により破骨細胞の分化・成熟抑制活性が失われる。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1 / 1

第 1 図



THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/02859

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. C1⁶ C12N15/00, C12P21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. C1⁶ C12N15/00, C12P21/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, GENETYX-CDROM, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Cancer Research, (1995), Vol. 55, Toshiyuki Yoneda, et al. "Sumarin suppresses hypercalcemia and osteoclastic bone resorption in nude mice bearing a human squamous cancer" P. 1989-1993	1 - 4
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1990) Vol. 87 Kukita A. et al. "Osteoinductive factor inhibits formation of human osteoclast-like cells" P. 3023-3026	1 - 4

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
September 29, 1997 (29. 09. 97)

Date of mailing of the international search report
October 7, 1997 (07. 10. 97)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. cl.⁶ C12N15/00, C12P21/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. cl.⁶ C12N15/00, C12P21/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, GENETYX-CDROM, BIOSIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Cancer Research, (1995), VOL. 55, Toshiyuki Yoneda et al 「Sumarin suppresses hypercalcemia and osteoclastic bone resorption in nude mice bearing a human squamous cancer」 P. 1989-1993	1-4
A	Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1990) VOL. 87 Kukita A. et al 「Osteoinductive factor inhibits formation of human osteoclast-like cells」 P. 3023-3026	1-4

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

29. 09. 97

国際調査報告の発送日

07.10.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

藤田 節

4B

8515

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

THIS PAGE BLANK (USPTO)